Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 59- 68

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص. 68-59

اثر روش‌های استخراج بر میزان ترکیبات فنولیک و خصوصیات ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه انا‌ریجه (*Pimpinella affinis*)

الهام شکوه صارمی[1]- محمدباقر حبیبی نجفی[2*]- محمد حسین حدادخداپرست[2]- معصومه بحرینی[3]

تاریخ دریافت: 1395/07/13
تاریخ پذیرش: 1395/12/08

چکیده

افزایش تقاضا برای افزودنی‌های ایمن منجر به افزایش استفاده از ترکیبات ضدمیکروب طبیعی شده است. از آنجایی‌که سبزیجات برگی منبع خوبی از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی هستند، این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره گیاه اناریجه (*pimpinella affinis*) که با روش‌های مختلف ماسراسیون، استفاده از سیال فوق بحرانی و استفاده از اولتراسوند استخراج شده بود، انجام شد. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) و حداقل غلظت‌کشندگی (MBC) عصاره‌ها با استفاده از روش میکرودایلوشن برای سویه‌های میکروبی *لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آیروژنز و اشریشیاکلی* میکروبی تعیین شد. فراکسیون ترکیبات فنولی با استفاده از دستگاه LC-MS تعیین شد. مقادیر فنول کل عصاره‌ها بین 1502/25-1836/69 (mgGA/100gE) بود. نتایج نشان داد روش استخراج با اولتراسوند بالاترین میزان ترکیبات فنولی را داشت. کمترین و بیشترین مقادیر MIC و MBC به‌ترتیب به عصاره‌های استخراج شده با روش اولتراسوند و روش فوق بحرانی تعلق داشت.*استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین باکتری و *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آیروژنز* مقاوم‌ترین باکتری‌ها بودند. عصاره اناریجه به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی از قبیل گالیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، کامپفرول و آپیجنین دارای فعالیت ضدمیکروبی است و می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی طبیعی مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: اناریجه، اولتراسوند، ماسراسیون، فوق بحرانی، روش‌های استخراج، فعالیت ضدمیکروبی

مقدمه

بیماری‌های مرتبط با مواد غذایی یکی از بزرگترین نگرانی‌های مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان مواد غذایی است که منجر به افزایش توجه به استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی و در نتیجه بهبود کیفیت و افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی شده است. از سوی دیگر نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد نگهدارنده‌های سنتزی مورد استفاده در مواد غذایی؛ که منجر به اثرات سرطانزایی، مشکلات گوارشی، نارسایی‌های کبد و ضعف سیستم ایمنی در بدن می‌شود، باعث افزایش تقاضا برای ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی شده است(Tajkarimi *et al.*,2010).ترکیبات ضدمیکروب طبیعی می‌توانند از منابع گوناگون مانند گیاهان، حیوانات، باکتری‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌ها تهیه شوند. مطالعات گوناگون نشان‌دهنده اثرات ضدمیکروبی ترکیبات گیاهی در محصولات غذایی است (Cowan, 1999; Gyawali& Ibrahim, 2012; Hayek *et al.*,2013). از سوی دیگر بروز مقاومت دارویی در انواع ریزسازواره‌ها نیاز مستمر در زمینه شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی جدید، جهت به حداقل رسانیدن مقاومت دارویی ریزسازواره‌ها و استفاده از آن‌ها به‌عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی را دو چندان نموده است (Celiktas *et al.*, 2007). عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات ضدمیکروبی، ضداکسایشی و عوامل حذف‌کننده رادیکال آزاد، توانایی بالایی برای به‌کارگیری به‌عنوان یک نگهدارنده طبیعی را دارا هستند (Tajkarimi *et al.*,2010; Hussain *et al.*, 2008). اناریجه[4] گیاهی است یکساله با ارتفاع 20-110 سانتی‌متر که در مناطق مختلف عراق، سوریه و نواحی مرکزی و شمالی ایران، رشد می‌کند و دارای گل‌های سفید و میوه‌های بیضی شکل است (Bozin *etal.*,2006). این گیاه دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده (Mozaffarian, 1996) و در طب

1 و 2- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
3- استادیار، گروه زیست، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: habibi@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.59302

4 *Pimpinella affinis*

سنتی از آن به‌عنوان ضدنفخ، ضدعفونی‌کننده، ضداسپاسم و ادرار آور استفاده می‌شود (Gulcin *et al.*, 2003). برای استخراج عصاره از روش‌های مختلفی استفاده می شود که از آن جمله می‌توان به تقطیر، ماسراسیون، خیساندن، استخراج با فشار، مایکروویو، سیال فوق بحرانی و استفاده از امواج اولتراسوند اشاره نمود. روش ماسراسیون نیاز به حلال بسیار زیادی دارد و منجر به آلودگی محیط زیست می‌شود. استخراج با سیال فوق بحرانی که با استفاده از یک سیال بی اثر، غیرقابل اشتعال و غیر سمی مانند دی‌اکسیدکربن انجام می‌شود؛ روش دوستدار محیط زیست است. روش استخراج با کمک امواج اولتراسوند یکی از روش‌های نوین استخراج ترکیبات فعال است که علاوه بر کاهش زمان استخراج، با ایجاد پدیده کاویتاسیون، منجر به نفوذ حلال به درون بافت‌های گیاهی می‌شود و راندمان استخراج را افزایش می‌دهد (Razavi & Esmaeilzadeh kenari, 2016). هدف از این مطالعه بررسی اثر روش‌های مختلف استخراج بر فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه اناریجه و شناسایی ترکیبات موثره عصاره بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت مرک آلمان و سیگما آلدریچ خریداری شدند و همگی از درجه HPLC برخوردار بودند. گیاه اناریجه بعد از جمع‌آوری از رویشگاه‌های طبیعی این گیاه در استان مازندران توسط بخش گیاه‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ساری مورد تایید قرار گرفت. سپس در محیط خشک و تاریک به دور از نور خورشید و در جریان هوا خشک شد و با آسیاب بصورت پودر درآمد وتوسط الک با مش 80 (800 میکرون) الک شد و تا زمان استفاده در کیسه پلی اتیلنی دو لایه تیره در یخچال با دمای 4°C نگهداری شد.

استخراج عصاره برگ اناریجه

روش ماسراسیون

به‌طور خلاصه 20 گرم پودر گیاه اناریجه به نسبت 1 به 5 (100 گرم پودر گیاه اناریجه و 500 میلی‌لیتر حلال) با حلال اتانول: آب به نسبت حجمی (50:50) به مدت 48 ساعت در شیکر با سرعت 1600 دور در دقیقه ترکیب شد تا عصاره استخراج شود. حلال اضافی به وسیله روتاری اواپراتور (دمای 45°C) تبخیر و تا زمان استفاده در فریزر با دمای ‎-18°C نگهداری شد (Tabanca *et al.*, 2007).

روش فوق بحرانی

10 گرم از نمونه پودر شده گیاه اناریجه به نسبت 1 به 10 با حلال اتانول: آب (50:50) مخلوط شد. عصاره‌گیری توسط دی‌اکسیدکربن فوق بحرانی در دمای 35°C، فشار 100 اتمسفر به مدت 30 دقیقه و با استفاده از دستگاه (Suprex MPS/225 Multipurpose) انجام شد. از متانول به‌عنوان حلال تعدیل‌کننده استفاده شد. عصاره استخراج شده بعد از تبخیر حلال توسط روتاری اواپراتور (45°C)، در دمای ‎-18°C نگهداری گردید (Tachakittirungrod *et al.*, 2007).

روش اولتراسوند

20 گرم نمونه پودر شده گیاه اناریجه با ترازو توزین شد و با 100 میلی‌لیتر حلال (1:5) اتانول- آب به نسبت حجمی (50:50) مخلوط گردید و در حمام اولتراسوند (Elmas model 690/H) به مدت 30 دقیقه و 35°C و فرکانس 35 کیلوهرتز قرار گرفت و حلال اضافی با استفاده از روتاری اواپراتور (45°C) تبخیر شد. عصاره تغلیظ شده تا زمان استفاده در فریزر با دمای ‎-18°C نگهداری شد (Goli *et al.*, 2005).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی

در این روش مقدار 0/5 میلی‌لیتر از عصاره با 5 میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچوکه به نسبت 1 به 10با آب مقطر رقیق شده بود، مخلوط گردید. سپس 4میلی‌لیتر سدیم کربنات (1 مولار) به آن اضافه شد و به مدت 15دقیقه در حمام آبی با دمای 45°C قرار گرفتند تا فاز آبی گسترش یابد و سپس جذب آن در 765 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد و مقدار فنول نمونه‌ها با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی ($Y = 1.02x + 0.431$) بر اساس میلی‌اکی‌والان اسید گالیک بر گرم عصاره بیان شد (Albu *et al.*, 2004).

تهیه محلول‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی *لیستریا مونوسیتوژنز*[1] (ATCC19112)، *استافیلوکوکوس اورئوس*[2] (ATCC25923)، *سودوموناس آیروژنز*[3] (ATCC9027) و *اشریشیاکلی*[4] (ATCC25922) میکروبی به‌صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از کلکسیون بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های ایران (IROST[5]) تهیه و توسط محیط کشت TSB[6]احیا شدند. بعد

1 *Listeria monocytogenes*
2 *Staphylococcus aureus*
3 *Pseudomonas aeruginosa*
4 *Escherichia coli*
5 Iranian Research Organization for Science and Technology
6 Tryptic Soy Broth

از تهیه محیط کشت مادر، باکتری‌ها به مدت 24-18 ساعت در محیط MHB[1] (دمای 37°C) برده شدند (کشت شبانه).

تهیه رقت‌های مختلف عصاره و لاکتات سدیم

محلول‌های استوک هر کدام از عصاره‌ها تهیه شد. سریال رقت‌های مختلف عصاره‌ها با غلظت‌های 0/01 تا 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در دی متیل سولفوکسید 2/5% تهیه شد و سپس با عبور از سرنگ استریل0/22 میکرومتر (Minisart, NML) عصاره‌ها استریل شدند. از لاکتات سدیم به‌عنوان ماده نگهدارنده استاندارد مواد غذایی استفاده شد. استاندارد میکروبی لاکتات سدیم (60 درصد وزنی/ وزنی) در دی متیل سولفوکسید[2] (5% حجمی/حجمی) آماده شد و رقت‌های گوناگون سدیم لاکتات از 0/1 تا 20 میلی گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد (Boziarin, *et.al.*, 2011).

تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی عصاره

به‌منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از روش میکرودایلوشن[3] در پلیت 96 خانه‌ای استریل استفاده شد (NCCL، 2000). 70 میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث در چاهک‌ها قرار گرفت. سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک فارلند (معادل 70 میکرولیتر که حاوی $1/5\times10^8$CFU/ml کلنی باکتری در هر میلی‌لیتر است) برای هر یک از سوش‌ها، جهت تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی عصاره‌ها به میکروپلیت‌های 96 خانه‌ای اضافه شد و سپس 70 میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره به هر چاهک اضافه شد (Donald *et al.*, 2001). ستون سمت چپ که حاوی210 میکرولیتر محیط کشت MHB، دی متیل سولفوکسید 2/5% حجمی/ حجمی و ریزسازواره بود به‌عنوان کنترل مثبت و ستون سمت راست که حاوی 140 میکرولیتر محیط MHB و 70 میکرولیتر عصاره بود به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیت 96 خانه‌ای به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37 درجه گرمخانه‌گذاری شد (Singh *et al.*,2000; Baghi, 1996).

ممانعت از رشد ریزسازواره به‌وسیله اندازه‌گیری میزان جذب و با استفاده از دستگاه قرائت کننده الایزا، ELISA Reader (استاتفاکس-2100 در طول موج 630 نانومتر) ارزیابی گردید و اولین خانه با کمترین جذب قرائت شده به‌عنوان MIC (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) تعیین شد. تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد و میانگین داده‌های بدست آمده به‌عنوان نتایج MIC ارائه گردید (Corbo *et al.*, 2008).

1 Mueller-Hinton broth
2 Dimethyl sulfoxide (DMSO)
3 Microdilution

تعیین حداقل غلظت‌کشندگی باکتری

میزان 5 میکرولیتر از چاهک‌های روش MICکه رشد باکتری‌ها در آن‌ها کاملا متوقف شده بود به محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و کشت سطحی انجام شد. پلیت‌ها به مدت 22-24 ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند. پایین‌ترین غلظت عصاره که هیچ باکتری نتواند در آن‌ها رشد کند، به‌عنوان مقادیر MBC گزارش شدند (Oroojalian *et al.*, 2010).

تعیین فراکسیون ترکیبات فنولی عصاره با استفاده از LC-MS

برای شناسایی اجزای سازنده عصاره اناریجه از دستگاه کروماتوگرافی مایع (API 165Perkin-Elmer) استفاده شد. دستگاه دارای پمپ چهار قسمتی، نمونه‌گیر و آشکارساز اتوماتیک 1100 کروماتوگراف بود. اندازه آشکارساز 500-220 نانومتر و اندازه ستون 4/6 میلی‌متر×150 میلی‌متر و حجم تزریق 100 میکرولیتر بود. تنظیمات ESI[4] شامل درجه حرارت 35°C، یونیزاسیون الکترواسپری 4500 ولت، گاز (curtain gas) با فشار 8psi[5]، آشکارساز CEM 2300 ولت بود. محلول 1% فرمیک اسید در آب: استونیتریل با نسبت حجمی (95:5) تهیه شد و سپس محلول 0/12 میکروگرم بر میکرولیتر از عصاره در این محلول تهیه و به مدت 3 دقیقه در 13000g سانتریفوژ شد. 5 میکرولیتر از محلول تهیه شده برای آنالیز در دستگاه LC-MS مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک شامل آ) 0/1% فرمیک اسید در آب و ب) 0/1% فرمیک اسید در 90% استونیتریل: آب با نرخ جریان 500 میکرولیتر بر دقیقه بود. ترکیبات فنولی موجود در عصاره با مقایسه زمان بازداری ترکیبات با ترکیب فنولی استاندارد شناسایی شدند و مقدار آن‌ها بر حسب درصد بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری بر روی نتایج بدست آمده از تعیین MIC، MBC و میزان ترکیبات فنولی عصاره‌ها در قالب طرح آزمایشی کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 20 صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن و با استفاده از روش آنوای یک طرفه انجام شد. به‌منظور کاهش خطا کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

میزان ترکیبات فنولی عصاره

عصاره‌های گیاهی جمع‌آوری شده از منابع گیاهی دارای اثرات

4 ElectrosprayIonisation
5 Channel Electron Multiplier

ضدمیکروبی علیه باکتری‌ها، قارچهای رشته‌ای، مخمرها و ویروس‌ها هستند که به دلیل حضورترکیبات طبیعی پیچیده‌ای مانند هیدروکربن‌ها (ترپنوئیدها)، ترکیبات اکسیژن‌دار، الکل‌ها، اترها، استرها، کتون‌ها، آلدئیدها، لاکتون‌ها، فنول‌ها و فنول استرها می‌باشد (Stefanakis *et al.*,2014). ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌های گیاهی با اثر بر لایه فسفولیپیدی دیواره سلولی ریزسازواره‌ها باعث افزایش نفوذپذیری غشا و خروج محتوی سلول‌های ریزسازواره‌ها می‌شوند. همچنین ممکن است اثرات ضدمیکروبی خود را با اثر بر آنزیم آمینواسید دکربوکسیلاز ریزسازواره‌های هدف اعمال کنند (Ojagh *et al.*,2010). بر اساس نتایج به‌دست آمده از تجزیه و تحلیل کمی ترکیبات فنولی عصاره توسط روش اسپکتروفتومتری، میزان ترکیبات فنولی استخراج شده با روش‌های گوناگون 1502/25 تا 1836/69 (mg GA/100g) بود. همانطور که در جدول 1 مشاهده می‌شود ترکیبات فنولی در دو روش ماسراسیون و اولتراسوند با یکدیگر اختلاف معنی‌دار آماری نداشتند. عصاره استخراج شده به روش اولتراسوند بالاترین مقدار ترکیبات فنولی را داشت، لذا این عصاره برای شناسایی ترکیبات فنولی و فراکسیون‌ها مورد بررسی قرار گرفت. امواج اولتراسوند با ایجاد پدیده کاویتاسیون، دیواره سلولی بافت‌های گیاهی را تخریب و با افزایش نفوذ حلال به داخل سلول‌های گیاهی به خروج هرچه بیشتر ترکیبات فنولی عصاره کمک می‌کند (Hussain *et al.*, 2008). این نتایج با نتایج حسین و همکاران، (2008)، کارابگویک و همکاران(2014) و ته و بیرچ (2014) برای پوسته بادام‌زمینی، برگ گیلاس وتخم کتان مطابقت دارد که همگی آن‌ها اعلام نمودند اولتراسوند ترکیبات فنولی را به میزان بیشتری استخراج می‌نماید.

جدول 1- مقدار فنول کل اندازه‌گیری شده عصاره اناریجه به روش اسپکتروفتومتری

نوع روش عصاره‌گیری	فنول کل (mg GA/100g E)
ماسراسیون	1790/63±26/1[a]
سیال فوق بحرانی	1502/52±19/4[b]
اولتراسوند	1836/69±31/2[a]

حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح 5% است.

ترکیبات شناسایی شده در عصاره اناریجه

مهمترین ترکیبات شناسایی شده توسط دستگاه LC-MS در جدول 2 نشان داده شده است. عصاره اناریجه حاوی ترکیبات فنولی مانند گالیک اسید و آپیجنین است. مارستیک و همکاران (2013) ضمن بررسی اثرات ضداکسایشی و ضدمیکروبی عصاره زولنگ (از خانواده چتریان) وجود اسید گالیک و آپیجنین در عصاره را تایید نمودند.

در مطالعه آن‌ها هر دو عصاره متانولی و کلروفرمی زولنگ بر روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آیروژنز* و *اشریشیاکلی* دارای اثرات مهار کنندگی بودند. مقدار MICبرای هر سه عصاره 15/6 میکروگرم بر میلی لیتر بود. حلقه B فلاونوئید آپیجنین سنتز DNA و RNA را محدود می‌نماید (Cushnie & Lamb, 2005). ترکیب دیگر شناسایی شده در عصاره اناریجه کامپفرول بود که اثرات ضدباکتریایی آن ثابت شده است (Akroum *etal.*, 2009). این ترکیب احتمالا بر روی دیواره‌های سلولی باکتری‌ها اثر می‌گذارد و همچنین با غیرفعال نمودن آنزیم‌ها و از بین بردن همبستگی پوشش‌های پروتئینی باکتری اثرات ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کند (Cowan, 1999). ترکیبات فنولی پی-کوماریک و کافئیک اسید (شناسایی شده در عصاره اناریجه) دارای خاصیت ضدمیکروبی هستند (Mianabadi *et al.*,2015). تعداد و موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در ترکیبات فنولی موجود در عصاره فاکتور اصلی و موثر بر فعالیت ضداکسایشی این ترکیبات است (Ulte *et al.*, 2002) و با افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل فعالیت ضدمیکروبی عصاره افزایش می‌یابد (Cowan, 1999).

مقایسه حداقل غلظت‌کشندگی[1] و حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی[2] عصاره‌های مختلف

حداقل غلظت بازدارندگی، حداقل غلظتی از عصاره است که می‌تواند به میزان 90 درصد از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی، حداقل غلظتی ازعصاره است که باعث جلوگیری از رشد 99/9 درصد از باکتری‌ها می‌شود. نتایج نشان داد که ریزسازواره‌های *اشریشیاکلی*و *سودوموناس آیروژنز* نسبت به *لیستریامونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس*دارای حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت‌کشندگی بیشتری می‌باشند. عصاره اناریجه در غلظت‌های بالای 10 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر با هر کدام از روش های ماسراسیون، فوق بحرانی و با کمک اولتراسوند که استخراج شود بر روی باکتری‌ها دارای اثرات کشندگی است. حداقل

1 Minimom inhibitory concentration
2 Minimom bacteriocidial concemtration

غلظت ممانعت‌کنندگی و حداقل غلظت‌کشندگی ریزسازواره‌ها در روش اولتراسوند کمتر بود و بعد از آن به‌ترتیب عصاره استخراج شده به روش ماسراسیون و عصاره حاصل از روش فوق بحرانی قرار داشت (جدول 3). این نتایج با نتایج عروجعلیان و کرمانشاهی (2010) مطابقت دارد.

جدول2- ترکیب شیمیایی عصاره اناریجه

	مقدار (بر حسب درصد)	شاخص بازداری
Gallic acid	5/09	4/1
3-O-Caffeoylquinic acid	0/04	5/03
4-O-Caffeoylquinic acid	1/59	6/1
3-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid)	1/33	7/39
5-O-Caffeoylquinic acid	4/13	8/2
5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid)	0/07	8/22
chlorogenic Acid	31/54	11/32
3-feruloylquinic acid*a*	0/24	11/73
4-caffeoylquinic acid (cryptochlorogenic acid)	0/1	12
Quercetin-3-O-glucuronide	0/84	13/4
1,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0/03	13/9
5-feruloylquinic acid*a*	0/11	15/10
3,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0/02	15,12
Quercetin-*O*-dihexoside	1/34	15/22
1-feruloylquinic acid*a*	0/14	15/54
Cafeic acid	12/73	16/04
Apigenin-7-O-glucoside	3/26	16/1
Quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin)	1/05	16/8
Quercetin-3-*O*-galactoside (hyperoside)	1	18/3
Apigenin-acetyl-apiosylglucoside (acetyl-apiin)	8/14	18/42
Kaempferol 3-O-rutinoside	0/06	18/54
Quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin)	0/54	18/6
Apigenin-malonyl-apiosylglucoside (malonyl-apiin)	6/68	18/63
4,5-O-Dicaffeoylquinic acid	0/01	18/7
Kaempferol 3-O-glucoside	0/12	19/81
Quercetin-3-*O*-glucuronide (miquelianin)	0/06	20/28
Luteolin-7-O-glucoside	1/86	20/4
Apigenin-6-C-glucoside	11/19	21/5
1,5-dicaffeoylquinic acid	0/07	21/69
Rosmarinic acid	5/62	22/45
p-Coumaric acid derivative	0/83	34/11

بر اساس نتایج آن‌ها مقادیر MIC برای *استافیلوکوکوس اورئوس* کمتر از *اشریشیاکلی* بود. در مطالعه تارون و پینـدی (2013) بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره گیاه *Pimpinella tirupatiensis* با روش انتشار در دیسک نشان‌دهنده حساسیت بالاتر *اشریشیاکلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* بـود و مساحت ناحیه بازدارنـدگی بـرای *اشریشیاکلی* کمتر بود. جوادیان و همکـاران (1393) حـداکثر غلظت ممانعـت‌کننـدگی و حـداقل غلظـت‌کشـندگی بـرای بـاکتری‌هـای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آیروژنز* را که با عصاره آویشن تیمار شده بود، به‌ترتیب 10 و 20 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اعلام نمودند که در پژوهش حاضر برای عصاره ماسراسیونی بـه‌ترتیـب 5 و 7/25 به‌دست آمد و دلیل اختلاف نوع عصاره مورد بررسی بوده است. ایزدی و همکاران (2014) اعلام نمودند حداقل غلظت‌کشندگی با استفاده از روش میکرودایلوشن در مورد عصاره گیاه سرخاگل برای باکتری‌های *لیستریامونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی* و *سودوموناس آیروژنز*افزایش یافت.

این نتایج در مورد لیستریا با نتایج ما مطابقت داشت.

جدول 3- حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های مختلف

ریزسازواره	گرم	حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی(میلی گرم بر میلی لیتر)				حداقل غلظت‌کشندگی(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
		ماسراسیون	فوق بحرانی	اولتراسوند	لاکتات سدیم	ماسراسیون	فوق بحرانی	اولتراسوند	لاکتات سدیم
استافیلوکوکوس اورئوس	+	$5\pm0/5^{Bc}$	$5/5\pm0/5^{Bc}$	$4\pm0/25^{Cb}$	$13/5\pm1/3^{Ab}$	$10\pm0/6^{Cc}$	$12\pm1/3^{Bc}$	$10\pm1/08^{Cb}$	$16\pm1/2^{Ab}$
لیستریا منوسیتوژنز	+	$6/25\pm0/43^{Bb}$	$6/5\pm0/52^{Bb}$	$4\pm0/25^{Cb}$	$13/5\pm1/3^{Ab}$	13^{Bb}	$14\pm1/1^{Bb}$	$10\pm0/9^{Cb}$	$16\pm1/2^{Ab}$
سودوموناس آیروژنز	-	$7/25\pm0/25^{Ca}$	$9\pm0/5^{Ba}$	$8\pm0/5^{Ba}$	$16/5\pm1/14^{Aa}$	$15\pm0/75^{Ba}$	$18\pm1/3^{Aa}$	$14\pm1/1^{Ba}$	$18\pm1/2^{Aa}$
اشریشیاکلی	-	$7/25\pm0/25^{Ca}$	$9\pm0/5^{Ba}$	$8\pm0/5^{Ba}$	$16/5\pm1/14^{Aa}$	$15\pm0/75^{Ba}$	$18\pm1/3^{Aa}$	$14\pm1/1^{Ba}$	$18\pm1/3^{Aa}$

حروف کوچک غیر مشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح 5% است.

حروف بزرگ غیر مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح 5% است.

جامه‌دار و همکاران (2014)حداقل غلظت‌کشندگی برگ سنجد را 12/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه باکتری *سودوموناس آیروژنز* تعیین نمودند. عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های مختلف دارای اثرات ضدباکتریایی بر رشد *سودوموناس آیروژنز* هستند (Jemedar *et al.*,2014). نصیرپور و همکاران (1394) حساسیت بالاتر باکتری‌های گرم مثبت لیستریا و استافیلوکوکوس به عصاره‌های گیاهی نسبت به باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* را بـه علت تفاوت‌های ساختمانی ریزسازواره‌ها دانستند. در باکتری‌های گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب عصاره با ساختمان دیواره سلولی صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به‌صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه به‌صورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند. برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزا غالب موجود در عصاره‌ها را با فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها گزارش نموده‌اند(Corbo *et al.*, 2008).

مکانیسم دقیق اثرات ضدباکتریایی عصاره‌ها هنوز به‌طور کامل درک نشده است. به‌نظر می‌رسد ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق تغییر ساختار و عمل غشا سلولی اثرات ضدمیکروبی خود را اعمال می‌کنند. این ترکیبات با افزایش نفوذپذیری غشا منجر به افزایش حجم و متورم شدن سلول می‌شوند (Ziech *et al.*,2012; Kalemba & Kunicka, 2003). باکتری‌های گرم منفی علاوه بر پپتید و گلیکان، یک مایکولیک اسید هم دارند که سطح هیدروفیلی آن غنی ازمولکول‌های لیپوپلی ساکاریدی می‌باشد و به‌عنوان مانع در برابر آنتی بیوتیک‌ها عمل می‌کند (Kalemba & Kunicka, 2003). همچنین آنزیم‌های موجود در فضای پری‌پلاسمی (فسفاتازها و پروتئازها از گروه آنزیم‌های تجزیه‌ای و بتالاکتامازها (پنی‌سیلیناز) و آنزیم‌های فسفوریله‌کننده آمینوگلیکوزید از گروه آنزیم‌های سم‌زدا قادرند ملکول‌های وارد شده را تجزیه کنند. در مورد باکتری‌های گرم مثبت مواد ضدمیکروبی به‌راحتی دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب کرده که منجر به نشت سیتوپلاسم و انعقاد آن می‌شود (Duffy& Power, 2001; Negi *et al.*,2003). مکانیسم دیگر ضدمیکروبی ترکیبات فنولی توانایی آن‌ها در شکل‌دهی ترکیبات محلول سنگین با پروتئین‌ها است. این ترکیبات با تخریب گیرنده‌های سطحی دیواره باکتری‌ها، در سنتز پروتئین‌ها اختلال ایجاد می‌کند(Singh *et al.*,2000; Almajano *et al.*, 2008). لذا با توجه به توضیحات گفته شده دلیل بالاتر بودن حداقل غلظت‌کشندگی ریزسازواره‌های گرم منفی به خوبی توجیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه به بررسی اثر روش‌های مختلف استخراج بر خاصیت ضدمیکروبی عصاره برگ گیاه اناریجه پرداخته شد. نتایج نشان داد بین میزان ترکیبات فنولی عصاره و فعالیت ضدمیکروبی عصاره رابطه مستقیم وجود دارد. عصاره حاصل از روش اولتراسوند به دلیل دارا بودن مقادیر بالای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فعالیت ضدمیکروبی بالاتری نشان داد و مقادیر MIC و MBCکمتری نسبت به عصاره‌های حاصل از روش‌های ماسراسیون و فوق بحرانی داشتند. نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند که با توجه به اینکه عصاره اناریجه مضرات ضدمیکروب‌های سنتزی را ندارد می‌توان آن را به‌عنوان یک ضدمیکروب طبیعی در صنعت غذا استفاده نمود.

منابع

جوادیان، ف.، نصیری، ع.ا.، باقری، غ.، سپهری، ز.، کیانی، ز.، کشاورز، ک.، عنبری، م. 1393،بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی علیه باکتری‌های پسودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آرئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف. فصلنامه علمی پژوهشی

دانشگاه علوم پزشکی وخدمات درمانی زابل، 6(4)، 9-15.

نصیرپور، م.، یاورمنش، م.، محمدی ثانی، ع.، محمدزاده مقدم، م. 1394، بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره درمنه کوهی، (*Artemisia aucheri*) درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) وزوفا (*Hyssopus officinalis* L.) بر برخی از باکتریهای بیماریزا با منشا غذایی، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، 46(12)، 73-84.

Akroum, S., Bendjeddou, D., Satta, D., & Lalaoui, K., 2009, Antibacterial activity and acute toxicity effect offlavonoids extracted from Mentha longifolia. *AmericanEurasian Journal of Scientific Research*, 4,93-96.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, P. & Mason, J., 2004, Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinusofficinalis for the food and pharmaceutical industry.*Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3), 261–265.

Almajano, M. P., Carbo, R., Jimenez, J. A.,& Gorden, M. H., 2008, Antioxidant andAntimicrobial Activities of Tea Infusions.*Food Chemistry*, 108(1),55-63.

Baghi, N., 1996, Study of antimicrobial effect of salvia leriifolia.*Phdthesis*.Pharmacology faculty.Mashhadmedical science university.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., & Anackov, G., 2006, Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils.*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5), 1822-1828.

Boziaris, I.S., Kordila, A.& Neofitou, C, 2011, Microbial spoilage analysis and its effect on chemical changes and shelf-life of Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) stored in air at various temperatures. *International journal of food science and technology*, 46(4),887-895.

Celiktas, O. Y., Kocabas, E .E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., &Baser, K. H. C., 2007, Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100(2), 553-559.

Corbo, M. R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M., &DelNobile, M. A., 2008, Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *International Journal of Food Microbiology*, 127(3), 261-267.

Cowan, M. M., 1999, Plant products as antimicrobial agents. *Clinical MicrobiologyReviews*, 12(4), 564-582.

Cushnie, T. P., & Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial activity offlavonoids.*International Journal of Antimicrobial Agents*, 26,343–356.

Donald, S., Prenzler, P. D., Autolovich, M., & Robards, K., 2001, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chemistry*, 73(1), 73-84.

Duffy, C. F., & Power, R. F., 2001, Antioxidant and antimicrobialproperties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6),527-529.

Goli, A.H., Barzegar M., & Sahari M. A., 2005, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521–525.

Gulcin, I., Oktay, M., Kıreccı, M., &Ku¨frevıog˘lu, O. I., 2003.Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinellaanisum* L.) seed extracts.*Food Chemistry*, 83(3), 371-382.

Gyawali, R., &Ibrahim, S. A., 2012, Impact of plant derivatives on the growth offoodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 95(1), 29-45.

Hayek, S. A., Gyawali, R., &Ibrahim, S. A., 2013, Antimicrobial natural products. InA. M_endez-Vilas (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them.*Science, Technology and Education*, 2, 910-921.

Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., &Przybylski, R., 2008, Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (Ocimum basilicum) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108(3), 986-995.

Izadi, Z., Sorooshzadeh, A., Modarres Sanavi, S.A.M., Esna-Ashari, M., & Davoodi, P., 2014, Investigation on antimicrobial effects of essential oil of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) and identification of its chemical compounds.*Iranian South Medical Journal*, 17(1), 58-69.

Jemedar, S., Zarabi, M., Mehrnezhad, F., & Yavarpour –Kordestani, V., 2014, The study of antimicrobial effect of Iranian plant extract on standard Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Medical Microbiology*, 8(2), 51-54.

Kalemba, D., & Kunicka, A., 2003, Antibacterial and antifungalproperties of essential oils.*Current Medical Chemistry*,10(10), 813-829.

Karabegovic, I.T., Stojicevic, S.S., Velickovic, D.T., Todorovic, Z. B., Nikolic, N. C., & Lazic, M. L., 2014, The effect of different extraction techniques on the compositionand antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. *Industrial Crops and Products*, 54, 142–148.

Marčetić, M., Petrović, S., Milenković, M., &Niketić, M., 2013, Composition, antimicrobial and antioxidant activity of the extracts of Eryngium palmatum Pančić and Vis. (Apiaceae).*Open Life Science*, 9(2), 149–155.

Mianabadi, M., Hoshani, M., & Salmanian.S., 2015, Antimicrobial and Anti-oxidative Effects of MethanolicExtract of

Dorema aucheri Boiss.*Journal of Agricultural Science and Technology*, 17, 623-634.

Mozaffarian, V. A., 1996, Dictionary of Iranian Plant Names. *Farhang Moaser*, 473-478.

Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., & Jena, B.S., 2003, Antioxidant and AntimutagenicActivities of Pomegranate Peel Extracts.*Food Chemistry*, 80(3),393-397.

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H., 2010, Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*, 120(1), 193–198.

Oroojalian, F., Kasra-kermanshahi, R., Azizi, M., & Bassami, M. R., 2010, Phytochemical composition ofthe essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens, *Food Chemistry*, 120(3), 765-770.

Razavi, R, & Esmaeilzadeh kenari, R., 2016, Antioxidant activity of red onion (*Allium cepa* L.) peel extract produced by maceration, ultrasonic assisted and supercritical extraction techniques. *First International Food Science and Technology Congress*, Iran, Tehran.

Singh, P. K., Tack, B. F., McCray, P. B., & Welsh, M. J., 2000, Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *American Journal of Physiology-Lung Cellularand Molecular Physiology*, 279(5), 799-805.

Stefanakis, M. K., Anastasopoulos, E., Katerinopoulos, H. E., &Makridis, P., 2014, Use of essential oils extracted from three Origanum species for disinfection of cultured rotifers (*Brachionus plicatilis*).*Aquacultre Research*, 45(11), 1861-1866.

Tabanca, N., M, G., Pasco, D. S., Bedir, E., Kirimer, N., Husnu, K., Baser, C., Khan, I. A., &Khan, S. I., 2007, Effect of Essential Oils and Isolated Compounds from Pimpinella Species on NF-B: A Target for Anti-inflammatory Therapy. *Phytotherapy Research*, 21(8), 741-745.

Tachakittirungrod, S., Okonogi, & Chowwanapoonpohn, S., 2007, Study on antioxidant activity ofcertain plants in Thailand: mechanism of antioxidantactionof guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103(2), 381–388.

Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food.*Food Control*, 21(9), 1199-1218.

Tharun G., & Kumar Pindi, P., 2013, Evaluation of antioxidant potential andantimicrobial activity of successive extractsof Pimpinella tirupatiensis.*Journal of Pharmacy Research*, 7, 817-822.

The, S., & Brich, J. B., 2014, Effect of ultrasonic treatment on the polyphenol content and antioxidant capacity of extract from defatted hemp, flax and canola seed cakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 346–353.

Ulte, A., Bennik, M.H.J., & Moezelaar, R., 2002, The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen Bacillus cereus. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.

Ziech, D., Anestopoulos, I., Hanafi, R., Voulgaridou,G. P., Franco, R., & Georgakilas, A. G., 2012, Pleiotrophic effects of natural products in ROS inducedcarcinogenesis: the role of plant-derivednatural products in oral cancer chemoprevention,*Cancer Letters*, 327(1), 16-25.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 1, Apr. May. 2018, p. 59- 68

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 1، فروردین-اردیبهشت 1397 ص. 68-59

Effect of extraction methods on phenolic content and antimicrobial properties of pimpinella affinis leaf

E. Shekouh Saremi[1], M. B. Habibi Najafi[2*], M. H. Hadad Khodaparast[2], M. Baheini[3]

Received: 2016.10.14
Accepted: 2017.02.28

Introduction: It has been well demonstrated that vegetables provide, in addition to other basic nutrients, bioactive substances with beneficial effects on human health. In fact, the consumption of vegetables has been associated with lower incidence and lower mortality rates of cancer and cardiovascular diseases in humans. Increasing demand for natural additives has shifted the attention from synthetic to natural antimicrobial agents. Leafy vegetables are found to be good source of antimicrobial agents. This study was aimed to examine the antimicrobial activity of leaf extracts of pimpinella affinis. Pimpinella affinis is a member of the family Apiaceae. This biennial herb grows up to 110 cm tall and is native in central and northern parts of Iran. In traditional medicine this herb is being used as carminative agent, appetizer, diuretic, antispasmodic drug, antimicrobial, sedative and lactation medication. It has also been distinguished as an antioxidant and antibacterial agent. There are several methods of obtaining extract from plants including maceration, super critical fluid extraction, subcritical water extraction, microwave and ultrasonic assisted method.

Materials and Methods: After collection from natural habitats of Pimpinella affinis in Mazandaran Province, it was then approved by the Department of Botany of Faculty of Agriculture of University of Sari. The plant was dried in a dry and dark place away from the sun and then was pulverized in the mill and sieved by a mesh of 80 (800 microns). Pimpinella affinis extract obtained by using maceration extraction (ME), ultrasonic assisted method (UAE) and supercritical fluid extraction (SFE). Ethanol: water in 50:50 ratio used as solvent for extraction. Total phenolic content of different extracts was measured by Folin-ciocalteu method. The phenolic compounds fractions were determined using Liquid chromatography–mass spectrometry system. After preparing the mother culture medium, the bacteria were cultured in MHB medium (37 ° C) for 24-18 hours. Stock solutions were prepared from each of the extracts. Serial dilutions of the extracts at concentrations of 0.01 to 10 mg / ml in 2.5% dimethyl sulfoxide were prepared and then sterilized with 0.22 μm pore size syringe filter. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration assay (MBC) were determined by micro dilution method for listeria monocytogenes (ATCC19112), staphylococcus aureus (ATCC25923), pseudomonas aeruginosa (ATCC9027) and Escherichia coli (ATCC25922). Antimicrobial growth was inhibited by measuring the absorbance and ELISA Reader was used to determine the growth rate of microorganisms, and the first house with the lowest absorption read as MIC (mg /ml) was determined. Statistical analysis of MIC, MBC and phenolic compounds of extracts results was done in a completely randomized design and using SPSS software version 20. The comparison of the means was done using Duncan's test and one-way ANOVA method. In order to reduce the error, all experiments were performed in triplicate.

Results and Discussion: Total phenolic content of extracts ranged between 1502.25 to 1836.69 mg GA/100g E. The results showed that the ultrasonic assisted method have highest total phenolic content and the least phenolic content was observed in extract which obtained by supercritical fluid extraction. Chlorogenic Acid, Cafeic acid and Apigenin-6-C-glucoside were the predominant fractions in Pimpinella affinis which detected by Liquid chromatography–mass spectrometry system. The least and highest amount of MIC and MBC were belonged to ultrasonic assisted and supercritical fluid extracts, respectively. Staphylococcus aureus was most sensitive and Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa were most resistance bacteria. Pimpinella extract due to having phenolic compounds such as Gallic acid, Cafeic acid, Chlorogenic Acid, Kaempferol and Apigenin showed antimicrobial activity and can be used as natural antimicrobial agent.

Keywords: Pimpinella affinis, Ultrasonic assisted, Maceration, Supercritical Extraction, Antimicrobial

1 and 2. Ph.D Student and Professor, Department of Food and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.
(*- Corresponding Author Email: habibi@um.ac.ir)

Activity